

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-149949

(43)公開日 平成5年(1993)6月15日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 01 N 33/532	Z	8310-2J		
C 12 Q 1/70		8114-4B		
G 01 N 33/543	E	7906-2J		
// C 12 Q 1/48		6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平3-335580	(71)出願人 000226998 日清製粉株式会社 東京都中央区日本橋小網町19番12号
(22)出願日 平成3年(1991)11月26日	(72)発明者 佐々木 一幸 東京都練馬区光が丘7丁目3番7-404号 (72)発明者 佐藤 岳哉 埼玉県川越市末広町3丁目4番8号 (74)代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

(54)【発明の名称】 新規な微量物質測定法

(57)【要約】

本発明は、検体中の検出すべき微量物質をこの物質と特異的結合性を示す物質と反応させ、この特異的結合性物質は核酸によって標識されており、この標識核酸をDNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼを用いて増幅し、増幅されたDNAまたはRNA量から検体中の微量物質を検出・定量することからなる高感度検出法に関する。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出すべき物質をその物質に対して特異的な親和性を有する特異的結合性物質であって核酸で標識化されたものと反応させるか、または検出すべき物質と特異的結合性物質との複合体を形成した後にこの複合体を核酸で標識化するかし、そしてこの標識核酸をDNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼを用いて増幅し、この増幅したDNAまたはRNAを検出することにより検体中の物質を検出・定量することを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、細菌、ウイルス、寄生虫等の感染疾患の診断、自己免疫疾患等の診断、組織適合抗原の検出、ホルモンの検出、ホルモン異常の診断、癌診断、食品中の細菌毒素の検出等において微量の検体試料から微量物質を検出・定量する微量物質の高感度検出法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、微量生体物質の検出や測定には、免疫測定法、レセプター・アッセイ法等のように、生体物質と生体物質に対する特異的結合性物質との反応が好んで用いられている。これらの方法では、目的物質もしくはそれに対する特異的結合性物質、または特異的結合性物質に対する第3の結合性物質など、反応にかかる成分の一つを放射性物質や酵素などで標識し、最終的に反応した標識物を検出及び測定することにより、目的物質の検出及び定量を行うが、標識物の検出限界が目的物質の検出、測定の感度を定める最大要因となっている。これらの方法で通常用いられる標識物の検出限界は、例えば放射性物質の<sup>3</sup>Hで1fmol、<sup>125</sup>Iで10amolであり、酵素のβ-ガラクトシダーゼで0.2amol(120分子)である。これらの事は、検出及び測定の感度に理論的に限界があることを示している。しかも上記の検出限界は、例外的に感度の高い場合であって、実際にはある物質とそれに対する特異的結合性物質との親和性が、必ずしも満足できる程に高いとは限らないことが多い。

【0003】 酵素免疫測定法では、アビシン・ビオチン系を用いた増幅方法が一般的であるが、ビオチン化あるいはアビシン化した標識物の非特異的な結合によるバックグラウンドが高くなり、感度が悪くなるという欠点がある。高感度化の操作に特異性が非常に高い方法を採用することによって、バックグラウンドの干渉を抑えることが求められるところである。

【0004】 一方ポリメラーゼ・連鎖反応(PCRF)は、錠型となる特定のDNA領域に対して、その領域を挟むように2つのプライマーをアニールさせ、DNAポリメラーゼを用いた反応を繰り返すことによって、錠型の領域を特異的に増幅する方法である(特開昭61-274697号)。この方法を利用すれば、特定領域を1

0万～100万倍に増幅をする事が可能であり、試験中の1DNA分子の存在でも検出が行える事が報告されている(リ(H.L.)ラネイチャー(Nature、第335巻414～417頁、1988))。そこで微量検体を用いた遺伝子診断、ウイルス診断、微生物検出等の利用が考案されている。しかし、PCR法はDNAやRNAのような核酸を検出する目的には非常に優れた方法であるが、核酸以外の物質を増幅することは不可能であり、これらの検出には適用されないといった欠点がある。

## 10 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 このような状況において、従来の方法では極めて微量の生体物質特に核酸以外の物質を検出及び定量するのに感度が不十分であると考えられていたものに対して高感度の測定法を提供することが本発明の課題である。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、新規な検出法および測定法に関するものであり、検出および測定の限界を飛躍的に向上させ、標識物の検出限界に由来する問題に、最終的な解決を与えるものである。即ち、標識物として核酸を用い、目的とする物質に対して特異的に結合する物質を核酸で標識化し、これを目的物質と結合させた後に核酸を酵素的に増幅することを特徴とする簡便かつ迅速な高感度検出法である。本発明の技術は、標識物を用いた技術の全てに適用されうるものであり、従来のいかなる標識物質の検出および定量による微量の生体物質の測定法の代わりに用いることが出来るものである。

【0007】 すなわち、本発明は検出すべき物質をその物質に対して特異的な親和性を有する特異的結合性物質であって核酸で標識化されたものと反応させるか、または検出すべき物質と特異的結合性物質との複合体を形成した後にこの複合体を核酸で標識化するかして、検出すべき物質-特異的結合性物質-核酸の複合体を形成させ、そしてこの複合体中の標識核酸をDNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼを用いて増幅し、この増幅したDNAまたはRNAを検出することにより検体中の物質を検出・定量することを特徴とする方法に関するものである。

【0008】 本発明をさらに説明すれば、本発明は抗原と抗体、基質もしくは補酵素と酵素、リガンドと受容体、糖鎖とレクチン、並びにホルモンと特異結合タンパク質等の特異的な結合性を利用しており、被検液中の目的物質をマイクロプレート、ピーズ、ディスク片、ゲル等に固相化して単離した後、該目的物質に対して同様な特異的結合性を有する物質であって核酸で標識されたものを前記固相化した目的物質と結合させるか、被検液中の目的物質と該物質に対して特異的結合性を有し核酸で標識された物質との複合体を形成せしめた後に固相化するか、または該目的物質と特異的結合性物質との複合体

50

を固相化した後に核酸で標識する方法を選択することができ、そして、固相化された標識核酸をDNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼを用いて増幅し、増幅されたDNAまたはRNA量から被検液中の目的物質を検出・定量する方法に関するものである。ここにおいて、検出あるいは定量される該物質が、核酸を持っているか持っていないかは問題とならない。該目的物質が核酸を含んでいる場合には、その核酸中に含まれない塩基配列を標識に用いれば良い。いずれの場合であっても、標識に用いた核酸は、オリゴヌクレオチドからキロ塩基単位の大きさのものまで利用可能であるが、被標識物質と目的物質との特異的結合を妨害しない程度の大きさであることが望ましい。

【0009】標識に用いる核酸は、DNAでもRNAでもよく、さらには一本鎖でも二本鎖でもよい。しかし一本鎖のRNAは、被検液中あるいは増幅反応液中のRNase活性により、容易に分解されるので、一本鎖で用いる場合は一般的にDNAを使用するか、あるいは修飾ヌクレオチドで合成したRNase耐性のあるRNAの必要がある。二本鎖の場合は、いずれでもよい。

【0010】標識の方法は、標識核酸を合成する際に、タンパク質、脂質、糖等の生物学的成分と結合し得るよう、予め修飾を加えておき、次に該標識物と被標識物を反応させて結合することにより行われる。例えば、核酸の5'末端にSH基を導入し、予めタンパク質に導入しておいたマレイミド基と反応させることにより標識する方法が知られている(PCR Protocols, 著者Innisら, Academic Press, 1990)。あるいは、上記SH基と生物学的成分のSH基を酸化することにより、ジスルフィド結合を形成させることも可能である。この結合は、後述するように、還元剤を用いて可逆的に切断されるので増幅反応の際に便利である。

【0011】アビシン・ビオチンのような特異的かつ強い結合性を利用して、間接的に核酸を結合することも可能である。例えば、まず検出するべき目的物質に対する特異的結合性物質をビオチン化しておき、次にこの標識ビオチンに対して過剰のアビシンを結合させる。1分子のアビシンは4分子のビオチンと結合し得るが、アビシン過剰の条件下においては、標識ビオチンとアビシンが1対1の量比で結合し、被標識物質に結合したアビシンは、さらにビオチン3分子との結合能力を保持している。次に、Milligen/Bioscience社、Pharmacia社等から市販されているキットを用いて、予めビオチン化した核酸を反応させることによって、アビシンを介して核酸による標識が行える。この方法では、目的物質とそれに対して特異的な親和性を持つ特異的結合性物質が複合体を形成した後に、核酸による標識化が可能があるので、複合体の形成にほとんど影響を与えないで、大きな核酸分子でも標識として用いることが出来る。

【0012】標識核酸の増幅は、クレノウ(Klenow)D 50 DNA標識抗体を用いる方法

NAポリメラーゼまたはTaqポリメラーゼを用いて公知のPCR法(Saikiら, 1985, Science, 230, 1350-1345およびSaikiら, 1988, Science, 239, 487-491)で行うことが出来る。この方法では、錆型となる核酸とプライマーを適当に選択することによってバックグラウンドに影響を与えることなく感度の増幅が可能となる。DNAポリメラーゼ反応は1回の反応でDNA領域を倍化することができn回のサイクルにより原理的には2のn乗倍にDNAを増幅できることになる。従って反応を繰り返すことによりDNA領域を十倍から百倍にも増幅することができ、反応に用いるプローブの量及び反応の回数を適当に選ぶことによって、被検液中に存在する微量のDNA量を定量することが可能で、1分子のDNAでさえ検出することができる。

【0013】あるいは、標識DNAにRNAポリメラーゼによって転写される配列を入れておけば、RNAポリメラーゼを用いてRNAに転写することによる増幅も可能である。

【0014】標識核酸が必ずしも錆型として直接増幅される必要はない。例えば、標識には一本鎖のオリゴヌクレオチドを用い、錆型となるより大きな核酸をハイブリダイズさせてこれを増幅することも可能である。この場合標識は、ハイブリダイゼーションが行える程度の塩基数(十数個から数十個)があれば十分である。ハイブリッドを形成した錆型をPCR法で増幅する。あるいは、特開平2-131599に示されたように、RNAポリメラーゼで転写される信号増幅DNAをハイブリダイズさせる方法も可能である。

【0015】固相化された目的物質と標識特異的結合性物質が複合体を形成することによって固体担体に固相化された状態で、増幅を行ってもよいし、または、プロナーゼ及びプロテイナーゼK等のタンパク質分解酵素を用いて消化して、錆型となる核酸を遊離してから行うこと也可能である。遊離させる方法としては、ドデシル硫酸ナトリウム、サルコシン及びトライトンのような界面活性剤、もしくはチオシアニ酸イオン及びカルシウムイオン等のカオトロピックイオンを用いるか、熱、酸及びアルカリ処理を行うか、またはジオオスレイトールやβ-メルカプトエタノール等の還元剤を用いて遊離することも出来る。

【0016】増幅された核酸の検出は、それ自体公知の方法で、例えば放射性同位元素、酵素及び蛍光物質等を用いて行われる。検出方法としては増幅反応中に標識プライマーを使用するか、または反応液中の前駆物質に標識されたものを使用して、直接検出・定量する方法及び増幅核酸にハイブリダイズ、または特異的親和性を持つ標識物を使用する間接的方法がある。

【0017】実施例1

工程1. 抗グリセンチン抗体へのマレイミド基の導入  
グリセンチンN末端（1-32）に対するポリクローナル抗体（ウサギ抗血清の1gG画分）10mgをグリセンチンをリガンドとしたアフィニティクロマトを行い、抗グリセンチン抗体を精製した。精製した抗体を20mMリン酸ナトリウム（pH7.2）で1mg/0.3mlの濃度に調製した。これに30μlのN,N-ジメチルホルムアミドに溶かしたマレイミド試薬（N-（マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボン酸塩）0.1mgを加え、30℃で1時間反応させた。反応後、10分間遠心して、不溶物を取り除き、0.1Mリン酸ナトリウム（pH6.0）で平衡化したNAP-2カラム（Pharmacia社）を用いてゲルろ過を行い未反応のマレイミド試薬を取り除いた。0.5mlずつ分画した各画分の280nmの吸収を測定しピーク画分を集めめた。

## 【0018】工程2. 標識DNAの調製

DNAの合成は、全自动DNA合成機 Gene Assembler (Pharmacia社)を用いて、β-シアノエチル-ホスファアミダイト法により行った。合成DNAの5'末端へのSH基の導入には、C6-Thiolmodifier (Amersham社)を用い、DNAの合成の最後の段階で導入した。合成したDNAの配列は、以下に示すが、どの様な配列でも選択し得る。

【0019】5'-SH-CCGTGTATTC TATAGTGTCA CCTAAATCG  
T ATGTGTATGA TACATAAGGT

TATGTATTAA TTGTAGCCGC CGTTCT-OH 3'  
引続き、DNAの支持体よりの切り出し、脱保護基の処理、及び合成DNAの精製は、合成機供給者の指示する方法で行った。精製したDNAを0.1Mリン酸ナトリウム（pH6.0）で平衡化したNAP-1カラム（Pharmacia社製）を用いてゲルろ過を行い、1.5mlの0.1Mリン酸ナトリウム（pH6.0）溶液とした。

## 【0020】工程3. DNA標識抗体の調製

工程1の蛋白画分と工程2のDNA溶液を、それぞれ1.5mlずつ混合し、4℃で終夜反応してDNA-抗体の複合体（核酸標識抗体）を形成させた。次に、10分間遠心して不溶物を除いた後、MonoQカラム（Pharmacia社製）を用いてイオン交換カラムクロマトグラフィーを行い、未反応のDNAと抗体を除去した。2mlずつ分取して該複合体を集めた。該複合体が抗体活性を保持していることは、通例の方法でグリセンチンを固相化したマイクロプレートを用いた酵素抗体法により確認した。該複合体がDNAを保持していることは、以下の方法によって確認した。上記DNAの5'末端近傍と同配列のプライマー5'-GTATTCTATAGTGTCAACCTA-3' と、上記DNAの3'末端に相補的なプライマー5'-AGAACGGCGGCTACAATTAAT-3' を用いて、通常の方法にしたがってPCR增幅を行い、増幅されたDNAをゲル電気泳動にてプライマーと分離し、エチジウムプロマイド染色を行い、増幅されたDNAを検出した。

## 【0021】工程4. 1次抗体の固相化

ポリスチレンビーズを、50mMリン酸ナトリウム pH 7.0で10μg/mlの濃度に希釈したグリセンチンC末端に対するマウスモノクローナル抗体と混合し、4℃20時間攪拌して抗体を固相化した。次に、同リン酸バッファーにて4倍希釈したブロックエース（大日本製薬社製）を用いて、該ビーズのプロッキングを行った。PBS (10mMリン酸ナトリウム pH7.2, 0.15M塩化ナトリウム)で洗浄後、該ビーズは使用するまでPBS中に保存した。

## 【0022】測定

通例のサンドイッチEIA法（酵素免疫測定法、第3版、石川栄治ら著）と同様の操作を行い、被検出物質であるグリセンチンと標識抗体を、工程4において調製したビーズに固相化した。即ち、シリコナライズしたガラス試験管に該ビーズと組換え型ヒトグリセンチン1pgを加えて反応させた。0.05% Tweenを含むPBSで該ビーズを洗浄後、2次抗体として工程3で得られた複合体を用いて反応させた。次に、該ビーズを洗浄して未反応の標識抗体を除去した後、該ビーズをポリプロビレン微量遠心チューブに移し、Molecular Cloning 2版 (Sambrook ら著)に記載の公知の方法に従って、30回PCR增幅を行った。増幅されたDNAは、ゲル電気泳動を行い、エチジウムプロマイド染色にて確認された。

【0023】この結果は図1に示される。この図1は

- 1 DNAサイズマーカー (φX174 DNA/Hinf I)
- 2 PCRに用いるプライマー対
- 3 グリセンチン非添加検出系
- 4 グリセンチン 1pg 添加した検出系
- 5 標識に用いたDNA

の夫々についてPCR増幅後にその反応生産物の<sup>1/10</sup>量について4%アガロースゲル電気泳動を行いエチジウムプロマイド染色した場合の、この試剤により染色された夫々のバンドを写真で示すものである。写真中矢印で示されるバンドはPCRにより増幅されたDNAを示す。

【0024】このことから、EIA法では検出されなかった微量グリセンチンの検出が可能となった。

## 【0025】実施例2

## 5' ピオチン化DNAを用いた標識方法

## 工程1. ピオチン化プライマーの合成

全自动DNA合成機 Gene Assembler (Pharmacia社)を用いて、DNAプライマーの合成を行った。塩基配列は、5'-ATCGTCCATTCCGACAGCAT-3' で示され、市販のベクターpBR322の制限酵素EcoRVの切断部位から下流方向へ20塩基の長さと同じである。ピオチン化のためのアミノ基には、N-MMT-Hexanolamine linker (Milligen/Bioscience社)を用い、DNA

の合成の最後の段階で、合成DNAの5'末端へ導入した。5'末端のアミノ基のビオチン化は以下のようにして行った。NHS-Biotin (Pierce社) 5mgを450μlのDMF(ジメチルホルムアミド)に溶かし、合成DNA 120μg/450μlと混合して室温で1夜反応させた。未反応のビオチンは20%エタノールで平衡化したNAP-10およびNAP-25カラム (Pharmacia社) を通すことにより除いた。

**【0026】工程2. ビオチン化標識DNAの調製**

標識用ビオチン化DNAは、以下に述べる方法で調製した。制限酵素EcoRVとBamH Iで切り出された市販のベクターpBR322の192塩基対の断片を鏽型とし、工程1で調製したEcoR V側のプライマー100pmolと、塩基配列が5'-GATCCACAGGACGGGTGCG-3'であるBamH I側のプライマー5pmolを用いて100μlのTaqポリメラーゼ・バッファー中、2.5単位の耐熱性DNA合成酵素(宝酒造社製)を用い、PCR反応を行った。増幅DNAの確認は、1%アガロースゲル電気泳動により行った。電気泳動後、ゲル中のDNAをイモビロンN (Millipore社製)にサザンブロッティングし、次にアビシン-HRP(西洋わさびペーオキシダーゼ)とインキュベートして、ビオチン化DNAと結合させた。次に、HRPの基質であるOPD(オルトフェニレンジアミン)を加え、発色させることによりビオチン化DNAを持つ増幅DNAを検出した。

**【0027】測定**

ビーズに固相化する抗体には、インシュリン様成長因子結合タンパク質に対する抗体を用い、検出すべきインシュリン様成長因子結合タンパク質と、ビオチン化キット(Amersham社製)を用いて供給者の指示に従い予めビオチン化したインシュリン様成長因子とを実施例1の測定方法と同様の操作にて反応させた。このようにして抗体-検出すべき物質-特異的結合性物質の複合体を形成させた後、ビーズを洗浄して未反応のビオチン化インシュリン様成長因子を除去した。次にPBSで4000倍に希釈したアビシンDを加え、ビーズに固相化されているビオチン化インシュリン様成長因子と結合させた。結合しなかったアビシンDを除去した後、標識として上記ビオチン化DNAを加えた。ビーズを十分に洗浄した後、実施例1で述べた同様の方法にてDNAを増幅して検出操作を行った。

**【0028】**この結果は図2に示される。この図2は1および2 インシュリン様成長因子結合タンパク質非添加検出系

3および4 インシュリン様成長因子結合タンパク質50pg添加検出系

の夫々についてPCR増幅後にその反応生産物の1/10量について4%アガロースゲル電気泳動を行いエチジウムプロマイド染色した場合の、この試剤により染色され

た夫々のバンドを写真で示すものである。写真中矢印で示されたバンドはPCRにより増幅されたDNAを示す。

**【0029】**このことから、ホルモンとそれに対する特異結合タンパク質との結合のように、抗原と抗体の結合以外の特異的な結合性を用いた場合であっても、実施例1と同様に微量物質を検出することが可能であることが分かった。さらに、複合体を形成せしめた後に核酸標識を行った場合にも検出が可能である。

**【0030】実施例3**

DNA標識Fab'を用いた定量

**工程1. 抗アルカリホスファターゼFab'断片の調製**

特開昭63-209597に開示したアルカリホスファターゼに対する抗血清から、プロテインAカラム(BioRad社製)を用いて、供給者の指示にしたがってIgGを精製した。10mgのIgGを用いて、公知の方法(酵素免疫測定法、第3版、石川栄治著)に従って、Fab'断片を調製した。

**【0031】工程2. DNA標識Fab'の調製**

調製したFab'と、実施例1に記載の方法で調製した5'末端にSH基を持つDNAを等モル量混合し、室温で20時間反応させてDNA-Fab'複合体を形成させた。該複合体は、実施例1と同様の方法で精製した。該複合体の確認は次のように行った。予めポリスチレンビーズに固相化したアルカリホスファターゼと該複合体とを反応させた。次に、PCR反応を行って、DNAが増幅されることを確認した。

**【0032】測定**

**30 固相化1次抗体は、抗アルカリホスファターゼ・モノクローナル抗体No.21を、2次抗体には、DNAで標識された抗アルカリホスファターゼ・ポリクローナル抗体のFab'断片を用いて、実施例1の工程4と同様の操作を行った。ビーズを洗浄後、1mMジチオスレートールを含むTaqポリメラーゼ・バッファー中で、37℃1時間反応してDNAを遊離させた。次に、ラジオアイソトープを用いて、牧野の方法(実験医学、第9巻、p.103-106, 1991)に従ってPCR増幅を行ったところ、増幅されたDNAの定量が可能となつた。**

**【0033】**

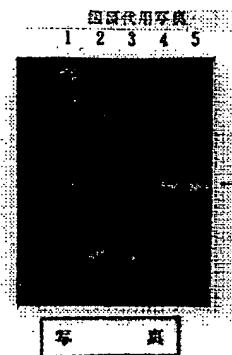
**【発明の効果】**本発明は従来検出限界の問題のために検出あるいは定量されなかった微量物質に対して検出・定量を可能にする高感度の測定方法を提供するものである。

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】**実施例1における試料のPCR増幅後の反応生産物の $^3$ H量について4%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムプロマイド染色した場合のこの試剤により染色された夫々のバンドを示す写真である。

【図2】実施例2における試料の同様の染色された夫々のバンドを示す写真である。

【図1】



【図2】



## 【手続補正書】

【提出日】平成4年8月7日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0002】

【従来の技術】従来、微量生体物質の検出や測定には、免疫測定法、レセプター・アッセイ法等のように、生体物質と生体物質に対する特異的結合性物質との反応が好んで用いられている。これらの方法では、目的物質もしくはそれに対する特異的結合性物質、または特異的結合性物質に対する第3の結合性物質など、反応にかかるる

成分の一つを放射性物質や酵素などで標識し、最終的に反応した標識物を検出及び測定することにより、目的物質の検出及び定量を行うが、標識物の検出限界が目的物質の検出、測定の感度を定める最大要因となっている。これらの方法で通常用いられる標識物の検出限界は、例えば放射性物質の<sup>3</sup>Hで1fmol、<sup>125</sup>Iで10amolであり、酵素のβ-ガラクトシダーゼで0.0002amol(120分子)である。これらの事は、検出及び測定の感度に理論的に限界があることを示している。しかも上記の検出限界は、例外的に感度の高い場合であって、實際にはある物質とそれに対する特異的結合性物質との親和性が、必ずしも満足できる程に高いとは限らないことが多い。